

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Licht- und elektronenmikroskopische
Untersuchungen an Mäusefoeten nach
Gaben von Beta - Aminopropionitril

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sigrid Klingner geb. Barth
aus Berlin

1970

Aus dem Kaiserlichen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor Prof. Dr. med. H.-L. Meyer

Licht- und elektronenmikroskopische
Untersuchungen an Mollusken
Geben von Beta-Aminopropionitril

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Verlegt von
der Königlich Preussischen Bibliothek
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Verlegt von

Ernst Klinger & Co. Berlin
am Berlin

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mäusefoeten nach Gaben von Beta - Aminopropionitril

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sigrid Klingner geb. Barth
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H.J. Merker

Korreferent: Prof. Dr. med. Vogel



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30. März 1978

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einleitung	1
Material und Methoden	12
Befund	15
Histologie	19
Elektronenmikroskopie	21
Diskussion	24
Zusammenfassung	36
Tabellen	
Abbildungen	
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	

Einleitung

Bei allen Überlegungen und Diskussionen über die empfindlichen, das heißt teratogenen Phasen muß berücksichtigt werden, daß die vorgeburtliche Entwicklung der Maus nur 19 Tage dauert, wobei am Geburtstermin $\pm$ 1,5 Tage stamesspezifische Differenzen bestehen können.

Nach Durchmusterung von Schnittserien durch den hier verwendeten Mäusestamm (NMRI) kann folgendes Zeitschema der Entwicklung kurz skizziert werden:

Vom 9. zum 10. Tag erfolgen die ventrale Krümmung und der Nabelanschluß. Die eigentliche embryonale Entwicklungsphase, die Organogenese, dauert etwa vom 10. bis zur Mitte des 12. Tages. Die Knospen der Extremitäten zeigen sich bereits am Tag 10. Am 12. Tag beginnen sich die proximalen Teile der vorderen Extremität zu differenzieren, das heißt, es treten die ersten Knorpelanlagen auf. Die weitere als "früh fetal" bezeichnete Entwicklung dauert von der Mitte des 12. Tages bis zum 14. Tag. Es entstehen das restliche Knorpelmodell des Skeletts mit dem Strahlenmuster in den distalen Extremitätenteilen. Am Tag 15

beginnt die Ossifikation des Knorpelmodells in den proximalen Teilen der Extremitäten, des Schulter- und Beckengürtels, der Wirbelsäule und eines Teiles der Rippen. Die bindegewebige Anlage des Desmocraniums verdichtet sich. Die späte fetale Entwicklung beinhaltet die Zeit vom 15. bis zum 19. Tag der Gestation. Am Tag 17 hat der Foet bereits die pränatale Form und am 18. und 19. Tag entstehen die bei der Geburt vorhandenen Proportionen.

Führt man nun während der verschiedenen pränatalen Entwicklungsphasen dem Embryo in den Zellstoffwechsel eingreifende, schädigende Substanzen zu, so kann man typische teratogene, embryotoxische oder embryonale Wirkungen erwarten. Die Zeitspannen, in denen die Erzeugung solcher Effekte besonders häufig gelingt, werden als sensible oder kritische Perioden bezeichnet. Die empfindliche Periode zur Erzeugung vieler klassischer Mißbildungen, besonders in den Extremitäten, liegt bei der Maus etwa zwischen Tag 9 und 12. Histologische Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt zeigen, daß während dieser Phase noch undifferenzierte Gewebverbände in starker Proliferation begriffen sind. Es bilden sich die sogenannten Blasteme. Am Ende dieser Blastemphase beginnen dann bereits Differenzierungspro-

zesse, in den Extremitäten z.B. in Richtung Knorpelbildung (5).

Auch biochemische Untersuchungen zeigen, daß die meisten der bisher bekannten teratogenen Substanzen in die hier wichtigen Vorgänge, also Replikation, Transskription, eventuell auch in die Translation eingreifen. Sie hemmen also die Entstehung und Differenzierung der Blasteme und Organanlagen (35, 37).

In neuerer Zeit ist allerdings diese klassische Vorstellung von der kritischen Periode etwas relativiert worden (3,26,27,28,41,52 u.a.m.). Wir kennen auf der einen Seite Substanzen, die schon in der Präimplantationsphase - obwohl hier der letale Faktor natürlich besonders hoch ist - Mißbildungen erzeugen (35,49). Auf der anderen Seite sind tiefgreifende Schäden an dem sich sehr spät entwickelnden Gehirn bei Gaben toxischer Substanzen am Ende der Schwangerschaft bei Ratte und Maus (1,22) bekannt.

In letzter Zeit ist darüber hinaus auch die Reifung des Mesenchyms und des daraus sich entwickelnden Skeletts interessant geworden. Ein wichtiger Faktor bei der Skelettentwicklung ist die Bildung der mesenchymalen interzellularen Substanz. Die Bildung und Rei-

fung dieser Substanz schließt sich zeitlich an das Blastemstadium an. Die kritische Periode für diese Vorgänge muß also nach der "klassischen" kritischen Periode liegen. Da sich solche Vorgänge bis weit in die postnatale Zeit hinein erstrecken und darüber hinaus ein cranio-caudales und, bezogen auf die Einzelextremität, ein proximo-distales Reifungsgefälle besteht, finden wir bei der Ratte und der Maus, die als sehr unreife Nesthocker geboren werden, die Neubildung und Reifung der mesenchymalen Interzellularsubstanz bis zum Ende der Schwangerschaft voll ausgeprägt (11,26,28,29,35).

Es ist leicht einsehbar, daß eine Störung der Interzellularsubstanzbildung, die das eigentliche funktionelle Element im Stützgewebe darstellt, zu einer fehlenden oder zumindest mangelhaften Anlage von Skelettstücken führt. Die Bedeutung der Interzellularsubstanz wird noch offenkundiger, wenn man sich klarmacht, daß diese kollagen- und proteoglycanhaltige Matrix die morphogenetischen Informationen über Zahl, Form, Lage und auch über die relative Größe der endgültigen Skelettstücke weitergibt (35). Nach Bildung des Knorpelstückes oder der Knorpelschablone sterben nämlich die Chondroblasten der ersten Mesenchymzellgeneration ab (31)

und auf der jetzt toten Matrixschablone siedelt sich, diese als Matritze benützend, eine zweite Mesenchymzellgeneration ab (Ersatzknochenbildung). Fehlt diese Schablone durch Verminderung der Interzellulärsubstanzbildung oder durch tiefgreifende quantitative oder qualitative Veränderungen der Synthese, Sekretion beziehungsweise Reifung dieser Substanz, so ist ein Aufwachsen eines neu mineralisierten Skelettstückes nicht möglich (28).

Substanzen, die in diesem Sinne am Mesenchym und seinen Derivaten schädigend wirken, können einen sehr unterschiedlichen Wirkungsmechanismus haben:

Sie können einmal die Synthese der Interzellulärsubstanz, also des Kollagens und der Glykosaminoglycane beziehungsweise der Proteoglycane hemmen, deren Sekretion stören oder aber bereits im extrazellulären Raum deren geordnete Aggregation und dreidimensionale Verknüpfung beeinflussen (23).

Daß nicht nur die Störung der Synthese und Sekretion der bindegewebigen Interzellulärsubstanz in der frühen Phase der Skelettentwicklung, sondern auch die Störung der Reifung dieser Substanz später zu Veränderungen am Skelettsystem führt, geht besonders aus

Beeinflussungen der Ossifikationsvorgänge hervor (26,27,28). Zur ordentlichen und genügenden Mineralisation des Knorpels ist eine qualitativ und quantitativ ausreichende Menge hochgeordneten Kollagens Voraussetzung. Nur dann kann die dreidimensionale Kollagen-Apatit-Beziehung zustandekommen (4,6,9,10,45). Eine Störung der Aggregation des Kollagens muß also auch zur Mineralisationsstörung und ihrer entsprechenden Folgen im Embryo führen. Diese Mineralisationsstörungen werden natürlich das Knochenwachstum, die Anlage der Knochenkerne und die Ausdehnung des alizarinrot-positiven Skeletts beeinflussen (28). Darüber hinaus spielen aber Mineralisationsstörungen an zwei Stellen der Morphogenese des Skeletts eine wesentliche Rolle:

Einmal scheint die Mineralisation der Interzellulärsubstanz des Vorknorpels ein wichtiger Reiz für das Einwachsen der zweiten Mesenchymzellgeneration in die vorliegende Knorpelschablone zu sein. Dann ist aber auch der um den diaphysären Bereich des Knorpels angelegten desmalen Knochenmanschette eine wesentliche Bedeutung beizumessen. Sie stabilisiert die Form des Röhrenknochens, während die zweite Mesenchymzellgeneration die primäre Markhöhle freiräumt. Sind ihre mechanischen Eigenschaften insuffizient, bricht das Knorpelmodell

zusammen und es können schwere Formänderungen resultieren (28,35).

Eine bekannte Substanz mit einer Wirkung auf das Kollagen der Interzellulärsubstanz ist das Beta-Aminopropionitril (BAPN). Dieses Mittel stammt aus den Samen der zur Familie der Hülsenfruchtgewächse zählenden Lathyrus-Gattungen. Nach Verfütterung wurden Entwicklungsverzögerungen der verschiedenen mesodermalen Gewebe und eine beträchtliche Zunahme des neutralsalzlöslichen Kollagengehaltes im Knochen beobachtet (23,24,25).

Der Wirkungsmechanismus des β -Aminopropionitrils soll auf seinem Einfluß auf die Vernetzung der Kollagenvorstufen zu größeren Einheiten beruhen, wodurch eine Zunahme des neutralsalzlöslichen Kollagens erreicht wird. Es wird vermutet, daß BAPN die Umwandlung des neu gebildeten Kollagens zu einem peptidgebundenen Semialdehyd verhindert, und zwar durch Hemmung eines kupferabhängigen Oxidationsschrittes (Lysil-Oxidase), der die Bildung dieses Semialdehyds einschließt (2,14,24,25,36,39,47).

Schon Ponseti und Shepard (1954) beschrieben Aortenaneurysmen, Hernien und Skelettdeformitäten nach Ver-

fütterung von Lathyrus-Odoratus-Samen an Ratten.

Coulson, Linker und Böttcher (1969) entdeckten nach Gabe von β -Aminopropionitril beim Schwein Exostosen und Hyperostosen besonders an den Muskelansätzen, sowie Periosthyperplasien an den flachen Knochen, leicht zerbrechliche Epiphysenplatten und gelegentliche Hämorrhagien. Lalich, Angevine und Madison (1970) sowie Heinemann (1972) beobachteten bei früh postnatal mit BAPN behandelten Versuchstieren (Ratten) Gefäßschäden und Motilitätsstörungen, besonders der hinteren Extremitäten, die sie auf Verformungen der Knie- und Hüftregion zurückführten.

Auf der Basis der oben geschilderten Überlegungen war es nicht verwunderlich, daß mit solchen Substanzen, die eine lathyrogene Wirkung auf das Mesenchym oder das Bindegewebe haben, auch Mißbildungen erzeugt werden konnten.

Roll und Bär (1968) fütterten trächtige Mäuseweibchen mit β -Aminopropionitril und beobachteten bei den Foeten als charakteristisches Mißbildungssyndrom Gaumenspalten, Rippendefekte, Mikrognathien, Kyphosen besonders im Bereich der Brustwirbelsäule, sowie deformierte Ulnae, Radii, Fibulae und Tibiae. Als beson-

ders empfindlich erkannten sie den Tag 13 und das Entwicklungsstadium gegen Ende der Schwangerschaft.

Von ähnlichen Ergebnissen berichten andere Autoren: Stamler (1955), Pyörälä et al. (1956), Walker und Wirtschaftfer (1956), Pratt und King (1972) und Steffek et al. (1972). Sie betonten die Tendenz des BAPNs, Gaumenspalten zu erzeugen. Eine damit übereinstimmende Meinung äußern Stivers et al. (1970). Chang et al. (1955) und Pratt et al. (1962) konnten darüber hinaus durch BAPN-Gaben an Hühnerkeimen an den Tagen 4 - 10 beziehungsweise 5 Skelettläsionen hervorrufen.

Die teratogene Wirkung des BAPN ist also zweifellos bewiesen und vom biochemischen Standpunkt aus verständlich. Noch nicht genau dargestellt sind aber die sogenannte kritische Periode und der formale Entstehungsmechanismus. Die kritische Periode mußte nach den bisher diskutierten Überlegungen relativ spät liegen. Sie soll in der hier vorliegenden Arbeit etwas genauer festgelegt werden.

Das Verhalten des hier verwendeten Mäusestammes (NMRI) ist aus vielen teratologischen Experimenten genau

bekannt. Nur auf der Basis solcher Kenntnisse lassen sich exakte Angaben über den Zeitfaktor und den morphologisch faßbaren Wirkungsmechanismus machen.

Trotz der zahlreichen bisher vorliegenden Befunde über die lathyrogene Wirkung von BAPN ist über die Morphologie dieser Vorgänge licht- oder elektronenmikroskopisch wenig Sicheres bekannt. Auch die nachweisbare teratogene Wirkung ist noch nicht mit morphologischen Methoden untersucht. Erst dann kann exakt der Angriffspunkt dieser Substanz diskutiert werden:

erstens am Aggregationsverhalten der kollagenen Strukturen,
zweitens am Mineralisationsprozess oder
drittens an anderen Vorgängen, z.B. am Syntheseverhalten der Zellen, an der Bündel- und Texturbildung der Fibrillen.

Besonders elektronenmikroskopische Untersuchungen dürften hier weiterführen, die in der Lage sind, die kollagenen Strukturen (Filament, Fibrille und Faser), die Apatit-Kristalle und damit auch das räumliche Kollagen-Apatit-Verhältnis genau darstellen zu können (4,6,27,32,45).

Darüber hinaus läßt diese Technik eine genaue funktionelle Beurteilung der beteiligten Zellen (Chondroblasten, Fibroblasten, Osteoblasten und andere Mesenchymzellen) zu (12,19,27,38,42).

Um diese Probleme anzugehen, soll deshalb nach Erfassen der Zeitabhängigkeit des teratogenen Effektes des β -Aminopropionitrils auf den Mäusestamm NMRI dieses Material histologisch und elektronenmikroskopisch durchgearbeitet werden. Sicher sollte auch der durch diese Substanz erzeugte Mißbildungstyp noch genauer analysiert werden.

Material und Methoden

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden schwangere Mäuseweibchen vom Stamm NMRI verwendet. Den Zeitpunkt der Begattung ermittelte man morgens durch den Nachweis eines Vaginalpfropfes. Die darauffolgenden 24 Stunden wurden als Tag 0 bezeichnet. Nach Trennung von den männlichen Tieren wurden die begatteten Mäuseweibchen unter Einbehaltung gleichbleibender Licht- und Temperaturverhältnisse mit freier Zufuhr von Futter (Altromin R) und Wasser gehalten.

Die Behandlung der trächtigen Weibchen erfolgte mittels einer Sonde durch orale Gabe von β -Aminopropionitril-fumarat (BAPN) in wässriger Lösung.

In einer ersten Versuchsreihe bekamen sechs Tiere am Tag 13 der Schwangerschaft, weitere fünf am Tag 14 und vierzehn Tiere am Tag 15 je 1000 mg/kg Körpergewicht BAPN. Außerdem wurden sechs Weibchen am 13., 14. und 15. Tag und weitere sechs Mäuse an den Tagen 14 und 15 täglich mit je 1000 mg/kg Körpergewicht Aminopropionitril gefüttert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden vier gravide

Mäuseweibchen an den Tagen 10, 11 und 12 der Schwangerschaft und nochmals vier Tiere an den Tagen 13, 14 und 15 mit je 1000 mg/kg Körpergewicht BAFN täglich behandelt. An den Tagen 16 und 17 der Gravidität bekamen drei weitere Mäuse je 1500 mg/kg Körpergewicht Aminopropionitril pro Tag.

Die Weibchen wurden jeweils am 18. Trächtigkeitstag durch Dekapitation getötet und die Foeten schnell per Kaiserschnitt entbunden.

Aus jedem Wurf wurden mindestens zwei Foeten für die Histologie in Bouin'scher Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und die angefertigten Serienschnitte mit HE, PAS, Azan oder Toluidin gefärbt.

Die Aufnahmen wurden an Zeissgeräten des Typs "Ultraphot" hergestellt.

Ein weiterer Foet aus jeder Versuchsgruppe wurde sofort für die elektronenmikroskopische Untersuchung zerteilt und die Extremitäten in einer modifizierten Karnovsky-Lösung (3%iges Paraformaldehyd und 3%iges Glutaraldehyd mit 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,2 gepuffert) fixiert, gewaschen, mit 1%iger gepufferter OsO_4 -Lösung nachfixiert, in Aceton entwässert und in Micropal eingebettet. Zur Darstellung der Proteoglycane

wurde sowohl der Karnovsky- als auch der OsO_4 -Fixierung Rutheniumrot (1 %) zugesetzt.

Die anschließend an LKB-Ultratomen hergestellten Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Die Aufnahmen fertigten wir mit Siemens-Elmiskopen I und Ia bei einer Strahlenspannung von 80 kV im Vergrößerungsbereich 2000 bis 40 000 an. Diese Platten konnten dann bis zu fünffach auf Positivpapier photographisch nachvergrößert werden.

Aus den restlichen Foeten erfolgte nach Formolfixierung und Entfernung der Bauch- und Thoraxorgane die Aufhellung: siebentägiges Bad in Äther/absoluter Alkohol im Verhältnis 1 : 3, dann Behandlung mit 10%iger KOH und 0,3%iger wässriger Alizarin-Lösung für ca. 3 bis 5 Tage, Spülen in Leitungswasser und für einige Stunden Behandlung mit Benzylalkohol, absolutem Alkohol und Glycerin im Verhältnis 1 : 2 : 2. Aufbewahrung in Glycerin. Anschließend untersuchten wir die aufgehellten Foeten unter dem Binokular-Lupenmikroskop systematisch auf Skelettanomalien und maßen die Länge der Extremitätenknochen.

Befund

Als Folge der Zufuhr von β -Aminopropionitril konnten Resorptionen (Zeichen des Fruchttodes) während der verschiedenen Stadien der Schwangerschaft, Entwicklungsverzögerungen an den Foeten und schließlich Mißbildungen erwartet werden. Deshalb wurden die Nachkommen der in verschiedenen Phasen der Trächtigkeit mit BAPN behandelten Mäuseweibchen nach der Schnittentbindung am Tag 18 p.c. gewogen, die Resorptionen und makroskopisch sichtbaren Schädigungen vermerkt.

Es muß allerdings betont werden, daß hier weniger auf die klassische teratologische Untersuchung Wert gelegt werden soll, sondern mehr die elektronenmikroskopisch - lichtmikroskopischen Befunde in den Vordergrund gestellt werden. Diese sehr aufwendige Technik verbietet die Auswertung großer Versuchsreihen. Auf eine statistische Aufstellung wird deshalb wegen der relativ geringen Tierzahlen weitgehend verzichtet. Jedoch bieten die erhobenen Befunde Hinweise für ein weiteres, statistisch relevantes Vorgehen (siehe Tabelle 1).

Histologie der Muttertiere:

Bis auf die an den Tagen 14 und 15 mit β -Aminopropionitril gefütterten Weibchen, die einige Lebernekrosen

aufwiesen, zeigten die behandelten Muttertiere keine auffälligen morphologischen Erscheinungen.

Teratologie (Tab. 1 - 3):

Die Muttertiere zeigten keine Veränderungen des Gewichtes gegenüber den Kontrollen und keine pathologischen Befunde bei der Sektion.

Die Auswertung des embryonalen Materials ergab einen relativ hohen, jedoch nicht sicher signifikanten Prozentsatz von Resorptionen aus den Gruppen der an den Tagen 13 - 15 (Tab.1) und der an den Tagen 10 - 12 behandelten Tiere. Die Weibchen, die das BAPN gegen Ende der Trächtigkeit erhielten, zeigten den Trend zu weniger Resorptionen und höheren Wurfzahlen, während die früh behandelten Mäuse eine Neigung zu kleineren Würfen bei höheren Resorptionsraten hatten.

Auch die Zahl der lebenden Foeten verhält sich entsprechend. Sie war bei allen von Tag 13 bis 15 behandelten Tieren am kleinsten (5 gegen 9/Tier bei den Kontrollen). Das Geburtsgewicht war nicht deutlich verändert, wenn auch die am längsten (3Tage) und die zuletzt - allerdings mit höheren Dosen behandelten Tiere (1500 mg/kg Körpergewicht) - eine leichte Tendenz zur Verringerung dieses Wertes zeigten. Interessant

ist eine leichte Gewichtszunahme der am Tag 14 behandelten Tiere.

Bei einigen Mäusen, die mehrfache Applikationen erhielten, traten große Hämatome unter der Haut auf, zum Beispiel zu 2,3 % in der Versuchsgruppe von Tag 14 - 15 und zu 14,3 % in der Versuchsgruppe von Tag 16 - 17. Sonst ließen sich bei äußerlicher Inspektion keine auffälligen Abweichungen von der Norm feststellen.

Nach Aufhellung und Färbung mit Alizarin wurden die Skelette der Foeten unter dem Binokular durchgemustert und die Länge der Röhrenknochen mit Zeiss-Meßokularen gemessen. In Tab. 2 sind die Skelettmaße der Foeten aufgeführt, deren Mütter β -Aminopropionitril während der Gravidität erhielten. Nachdem schon die Geburtsgewichte der am Tag 14 p.c. geschädigten Tiere über dem Durchschnitt der anderen Foeten lagen, weisen nun auch die Extremitätenknochen dieser Tiere eine gewisse Verlängerung auf. Die am Tag 16 und 17 mit höheren Dosen behandelten Tiere zeigen dagegen die Tendenz zur Verkürzung beziehungsweise zur Verringerung. Bei den Prozentabweichungen von den Kontrollen ist in keinem Fall die Signifikanzschränke erreicht, das heißt, es ist zwar eine Veränderung eingetreten, aber keine spezifische für die jeweilige Merkmalsausprägung (z.B. Radius).

Mißbildungen als Folge der während verschiedener Phasen der Trächtigkeit zugeführten schädigenden Substanz sind aus Tab. 3 zu ersehen. Es wurden Gaumenspalten und Deformierungen des harten Gaumens beobachtet. Die Veränderungen der Rippen und Extremitätenknochen bestanden vorwiegend aus Verbiegungen; bei Humerus, Femur und Tibia kamen Verbreiterungen im Bereich der Muskelansätze dazu. Die Tibia zeigte außerdem distale Umbiegung und Verbreiterung. - Im Bereich der Hals-, Brust- und Sacralwirbelsäule ergaben sich häufig Kyphosen und Kyphoskoliosen, zum Teil aber auch regelrechte Stauchungen. In einigen Fällen wirkten nicht nur einzelne Rippen, sondern der gesamte Brustkorb deformiert. Gegen Ende der Schwangerschaft zeigten die Epiphysenplatten eine deutliche Tendenz, sich vom Knochen zu lösen.

Besonders empfindlich im Hinblick auf die teratogene Wirkung scheinen die Tage 13 - 15 p.c. zu sein, wobei die Zufuhr von BAPN an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen eine nicht geringe Rolle spielt. Der hohe Prozentsatz an Gaumenspalten am Tag 13 ist leicht erklärlich, da die Entwicklung des harten Gaumens in diese Periode fällt.

Histologie (Abbildungen 4 und 5)

Die am Tag 18 der Schwangerschaft schnittentbundenen und präparierten Foeten wurden lichtmikroskopisch untersucht. Dabei konnten die bereits unter dem Binokular beobachteten Deformierungen der Extremitätenknöcheln bestätigt werden. Außerdem zeigt das histologische Bild deutlich die Verformungen im Wirbelbereich durch zusammengrückte und verformte Wirbelkörper.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Knochen allgemein zeigen sich bei den zuletzt mit hohen Dosen behandelten Tieren (Tag 16 - 17, 1500 mg/kg) die Knochenbälkchen in ihrer Größe und Anzahl verringert. Auch die perichondrale Knochenmanschette ist gegenüber Kontrollen dünner und fehlt an manchen Stellen völlig.

In vielen Längsschnitten durch die Epiphysenbereiche der langen Röhrenknochen fällt eine Verschmälerung des Blasenknorpel- und Säulenknorpelbereiches bei den am Tag 16 und 17 mit 1500 mg BAPN/kg behandelten Tieren auf. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da der Schnittwinkel nicht exakt bestimmt wer-

den konnte und wegen der Aufwendigkeit auch die Zahl der histologisch untersuchten Tiere zu gering war.

Als Folge der allgemeinen Auflockerung und Brüchigkeit des Mesenchyms bei den Nachkommen der mit BAPN behandelten Mäuseweibchen erscheinen ausgedehnte Blutungen, die zum Teil schon makroskopisch wahrgenommen werden konnten.

Unter dem Lichtmikroskop wurden besonders ausgeprägte Blutungen in Lunge, Leber und Muskel, sowie im Wirbelkanal und in einzelne Wirbelkörper einbrechend gefunden. Manchmal kamen auch Blutungen in der Gegend der Epiphysenplatten vor. Diese Erscheinungen traten bei Foeten auf, deren Mütter an den Tagen 13 - 15, 14 und 15 beziehungsweise 16 und 17 p.c. täglich mit BAPN gefüttert wurden.

Die an den Tagen 14 und 15 mit je 1000 mg β -Aminopropionitril/kg behandelten Foeten lassen vereinzelt Nekrosen in der Niere erkennen.

Elektronenmikroskopie (Abbildungen 6, 7, 8, 9)

An den Foeten, deren Muttertiere längere Zeit vor dem Termin der Fixierung BAPN erhalten hatten (bis einschließlich Tag 15), ließen sich elektronenmikroskopisch keine deutlichen feinstrukturellen Abweichungen von der Norm erfassen. Nur an den Foeten der Gruppe, die mit 1500 mg/kg am Tag 16 und 17 behandelt war, zeigten sich elektronenmikroskopisch fassbare Veränderungen. Am deutlichsten sind sie dort, wo im Behandlungszeitraum Kollagen neu gebildet werden mußte. Diese Produktion spielt sich vor allen Dingen im Knorpel des Epiphysenbereiches ab. Hier läßt sich in den Kontrolltieren eine gut entwickelte Interzellulärsubstanz darstellen, die 120 - 170 Å dicke Kollagenfilamente noch ohne deutliche Querstreifung und Proteoglycanstruktur enthält. Diese Proteoglycane (PG) stellen sich als 350 - 700 Å große rutheniumrot-positive, also elektronendichte Granula dar, die frei zwischen den Filamenten oder ihnen auf sitzend vorkommen und von denen sie feine Fäden ausstrahlen (50 Å).

Nach Behandlung mit BAPN (am Tag 16 und 17) ist die Zahl der kollagenen Filamente deutlich verringert.

Die Zahl der Proteoglycangranula scheint unverändert zu sein. In den Bezirken jedoch, die fast keine kollagenen Strukturen mehr enthalten, ist auch die Zahl der Proteoglycangranula deutlich verringert oder sie fehlen überhaupt. Dann entstehen umschriebene, optisch leere Bezirke im Interzellularraum. Es lassen sich jedoch Areale elektronenmikroskopisch erfassen, die vorwiegend PG-Granula enthalten. Das ist besonders in Nähe der Knorpelzellen der Fall, wo die neu synthetisierten und noch nicht aggregierten Kollagenvorstufen lokalisiert sein müssen.

Ein weiterer elektronenmikroskopisch zu erhebender Befund ist in den Bereichen der perichondralen, desmalen Knochenmanschette der Diaphyse am deutlichsten zu sehen. Hier sind die drusenartig beginnenden Mineralisationszentren aus vorwiegend radiär angeordneten Apatit-Kristallen (27, 57), die in den Kontrolltieren zu einer einheitlichen Manschette zusammengefloßen sind, noch teilweise isoliert zu beobachten. In den mineralisierten Arealen selbst sind die morphologischen Verhältnisse der Norm entsprechend: Am Beginn der Apatit-Einlagerung liegen die Kristalle noch ungeordnet - höchstens in der Peripherie vorwiegend radiär - und zeigen keine räumlich geordnete Be-

ziehung zu den kollagenen Fibrillen. Die Fibrillen sind hier etwa 250 - 350 Å dick und haben eine typische Querstreifung mit einer Periodenlänge von 600 Å. Wenn diese plaqueartigen Kristallaggregate zusammenfließen, ordnen sich die Apatit-Kristalle offenbar um und sind jetzt etagenartig entsprechend der Querstreifung parallel zu den kollagenen Fibrillen ausgerichtet.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß das Ausmaß und die Ausdehnung der Mineralisation bzw. der mineralisierten Bezirke geringer ist, die Feinstruktur der mineralisierten Gegenden selbst aber keine deutlichen Abweichungen von der Norm aufweist.

An den Zellen der uns hier interessierenden mesenchymalen Gewebe (Chondroblasten, Osteoblasten, Fibroblasten) waren keine Veränderungen zu erfassen. Auch die zufällig getroffenen und beurteilten übrigen Zellen und Gewebsarten (Epithel, Nerven, Gefäße, Muskeln) waren im elektronenmikroskopischen Bereich unauffällig.

Diskussion

Nachdem schon durch verschiedene Autoren die teratogene Wirkung des β -Aminopropionitril beobachtet wurde (46, 56), konnte auch durch die vorliegende Arbeit der schädliche Effekt dieser Substanz bestätigt werden.

Dabei zeigten sich Gaumenspalten, Deformierungen des harten Gaumens, Veränderungen der Rippen und Extremitätenknochen in Form von Verbiegungen und Verbreiterungen im Bereich der Muskelansätze, Kyphosen und Kyphoskoliosen, sowie besonders gegen Ende der Schwangerschaft eine Neigung der Epiphysenplatten, sich vom Knochen zu lösen.

Es wurde hier - wie bereits im Kapitel "Befunde" - nicht versucht, die geringen Tierzahlen statistisch vollständig durchzuarbeiten. Die histologischen Serienschnitte und vor allen Dingen die elektronenmikroskopische Aufarbeitung des Materials ist so aufwendig, daß große Reihen nicht bewältigt werden können. Die mit den üblichen teratologischen Methoden erhaltenen Werte sollten nur zur Absicherung einer vorhandenen teratogenen Wirkung dienen und auch etwas das Spektrum

der vorkommenden Mißbildungen aufzeigen.

Histologisch fiel schon an den am 13.-15. und 16.-17. Tag post conceptionem geschädigten Tieren eine allgemeine Auflockerung und Brüchigkeit des Mesenchyms auf, was z.T. schon zu makroskopisch sichtbaren Blutungen in den Organen, aber auch in den Wirbelkanal und in einzelne Wirbelkörper einbrechend führte.

Bei den an den Tagen 16 und 17 p.c. geschädigten Foeten ließ sich eine Verminderung der Knochenbälkchen in Größe und Anzahl erkennen, der Bereich des Blasen- und Säulenknorpels zeigte eine Versmälerung und die perichondrale Knochenmanschette war gegenüber der Norm dünner oder fehlte vollständig.

Im Elektronenmikroskop fällt nach BAPN-Zufuhr in der gleichen Zeit eine Abnahme der kollagenen Strukturen auf, während die Zahl der Proteoglycane unverändert ist.

Ein deutlicher Befund nach Gaben von BAPN war die Störung der Mineralisation besonders im Bereich der perichondralen Knochenmanschette.

Alle diese Effekte weisen auf eine Wirkung am Mesenchym hin. Als Grund für die Blutungen kann man eine Verminderung der mechanischen Eigenschaften, besonders des Turgordruckes in der Umgebung der Gefäße, vermuten. Während der intrauterinen Entwicklung besteht die Wand selbst der größeren Gefäße nur aus dem Endothel und einigen angelagerten pericytenähnlichen Mesenchymzellen. Die mechanische Festigkeit dem Blutdruck gegenüber wird durch den Turgordruck des umgebenden interstitiellen Raumes erreicht. Er kommt durch die Wasserbindungsfähigkeit der Proteoglycane zustande. Diese Strukturen wiederum sind an einem dreidimensionalen kollagenen Netzwerk verankert. Wird der Aufbau dieses Netzwerkes durch Störung der Aggregation der Vorstufen hemmend beeinflusst, so müssen sich auch die mechanischen Eigenschaften verändern. Die Folge sind Wandeinrisse und Blutungen. Diese Störung der funktionellen Einheit Endothel - mesenchymaler Interzellularraum wird sich gerade dort manifestieren, wo mechanische Einflüsse auf die Gefäßwand besonders stark sind, z.B. bei Eintritt von Gefäßen in mineralisierte Skelettabschnitte - Schädel, Rückenmark und in der Nähe stark deformierter Skelettstücke - (27, 35).

Die Wirkung des β -Aminopropionitrils auf die Form des sich entwickelnden Skelettsystems ist zweifellos ebenfalls über eine Beeinflussung der Aggregation in den kollagenen Vorstufen zu erklären. Die mechanische Funktion des Kollagens beruht im Wesentlichen auf dem Aufbau größerer Einheiten (Filament - Fibrille) und auf der Anordnung dieser Strukturen in einem bestimmten, der Funktion und der Belastung entsprechenden Muster. Gelingt die Aggregation nicht, so wird die Belastbarkeit des kollagenen Fasergerüsts geringer und es resultieren Deformitäten besonders im Bereich der langen Röhrenknochen, auch schon beim Embryo.

Aus unseren Befunden kann geschlossen werden, daß bereits intrauterin Belastungen auftreten, die diese Deformierungen hervorrufen. Zweifellos ist Mitte der Schwangerschaft das motorische System zum Teil schon funktionstüchtig, so daß Muskelkontraktionen bereits eine entsprechende Kraft ausüben können.

Neben dieser Erklärung muß jedoch noch auf die Funktion der mesenchymalen Interzellulärsubstanz verwiesen werden. Da während der Ersatzknochenbildung die erste Knorpelzellgeneration abstirbt (Blasenknorpel), gibt allein die

azelluläre Schablone der knorpeligen Interzellularsubstanz die morphogenetischen Informationen über Lage, Form, Zahl und relative Größe der sich entwickelnden Skelettstücke weiter. Eine Störung der Form des Knorpelmodells schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt wird dann von den aufwachsenden Ersatzknochen imitiert und entsprechend falsch weitergegeben. Hierbei spielt die perichondrale Knochenmanschette eine spezielle Rolle. Während nämlich das Knorpelmodell im diaphysären Bereich durch die zweite Mesenchymzellgeneration abgebaut wird, bildet allein die perichondrale Knochenmanschette den stabilisierenden Faktor zur Aufrechterhaltung der Form. Kommt es zur Mineralisationsstörung, werden bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, bei dem Einwirkungen des motorischen Systems noch keine wesentliche Bedeutung haben dürften, Deformitäten entstehen können (3,11,26,32).

Bei dieser Gelegenheit soll darauf hingewiesen werden, daß nach den Erfahrungen dieses Institutes bei allen embryotoxischen Substanzen, die die Mineralisation stören, während der intrauterinen Skelettentwicklung die desmale Ossifikation am stärksten betroffen ist. Die perichondrale Knochenmanschette entwickelt sich aber auf der Grundlage von desmalen Ossifikationsvorgängen (Merker, persönliche Mitteilungen). So sind denn hier

als auch im Bereich der desmalen Ossifikation im Schädelbereich deutliche Effekte mit der Alizarinrot-Methode nachweisbar.

Im elektronenmikroskopischen Bild drückt sich die gestörte Aggregation in einer Verminderung der Zahl der elektronenmikroskopisch fassbaren kollagenen Strukturen aus. Dieser Befund könnte natürlich auch eine Hemmung der Synthese bedeuten, jedoch sprechen biochemische Befunde nicht dafür (14, 24, 35). Eine andere Erklärung liegt deshalb näher:

Das unter dem Einfluß von β -Aminopropionitril in den intrazellulären Raum abgegebene Kollagen ist wegen der geringen Zahl der eingebauten Hydroxylisin-Moleküle nur in geringem Ausmaß vernetzt und deshalb viel leichter löslich. Es muß davon ausgegangen werden, daß während der verschiedenen Präparationsschritte solche Lösungsvorgänge ablaufen. Schon die verwendeten wässrigen Fixationsmittel als auch das häufige Waschen mit Pufferlösung sind geeignet, die leicht löslichen kollagenen Einheiten aus den Gewebestücken zu entfernen. Das elektronenmikroskopische Bild verringerter oder sogar fehlender Kollagenstrukturen in bestimmten Bezirken beruht also eigentlich auf einem Artefakt. Diese Artefakte aber machen die molekularen Vorgänge, die sonst nicht

sichtbar sind, besonders deutlich.

Die Ablehnung einer Kollagensynthesehemmung nach Gaben von BAPN trotz Verringerung der Kollagenstrukturen muß auch noch unter einem anderen Aspekt diskutiert werden, der durch die Arbeiten von Lane et al. (1971) aktuell geworden ist. Diese Autoren konnten nach Gaben von Prolin-Analogen auf Grund ihrer Befunde vermuten, daß eine Akkumulation von niedermolekularen Kollageneinheiten im Extrazellularraum offenbar über einen Rückkopplungsmechanismus auch die intrazelluläre Kollagensynthese hemmend beeinflusst. Dabei ist natürlich ein Zeitfaktor zu berücksichtigen. Die Nachprüfung dieser auch für die Klinik hochinteressanten Befunde mit anderen ähnlich wirkenden Substanzen, z.B. β -Aminopropionitril, wäre wünschenswert.

Der elektronenmikroskopisch besonders deutliche Effekt des BAPNs während der Mineralisation kann ebenfalls auf den Angriffspunkt am Kollagen zurückgeführt werden. Wie aus anderen Arbeiten hervorgeht (11, 32) ist zwar für den Beginn der Mineralisation, der elektronenmikroskopisch meist in Form von Plaques oder Drusen aus Apatit-Kristallen sichtbar wird, Kollagen keine Voraussetzung. Die späteren Phasen aber, die Bildung größerer mineralisierter Areale und der geordnete Einbau der

Apatit-Kristalle, sind jedoch an die Anwesenheit von intakten Kollagenfibrillen bestimmter Dicke und bestimmter Anordnung gebunden (13, 17, 45, 54).

Eine Störung der Vernetzung innerhalb der Kollagenfibrillen und anderer Parameter innerhalb des Kollagenaufbaues müssen deshalb notwendigerweise zu einer Störung der Apatit-Kollagen-Beziehung und damit der Mineralisation führen.

Die durchgeführten Längenmessungen der Röhrenknochen-Anlagen wurden unter dem Verdacht unternommen, eine Wirkung des BAPN auf die knorpelige Interzellulärsubstanz auf diesem Wege erfassen zu können. Es ergaben sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Es zeigt sich hier ein Befund, der inzwischen schon auf anderen Wegen verifiziert werden konnte. Das Kollagen ist für die Ausprägung des typischen Knorpel-Erscheinungsbildes nicht unbedingt erforderlich. Hier ist das Vorhandensein eines typischen qualitativ und quantitativ intakten Proteoglycanmusters viel wichtiger (35). Ähnliches scheint in abgewandelter Form auch für den Knochen zu gelten. Etwa verändertes Kollagen, z.B. durch BAPN, lässt immer noch ein knochenähnliches Gewebe entstehen. Allerdings ist dann die exakte Mineralisation gestört.

Auffällig ist auch die Notwendigkeit einer längerdauernden Applikation bei den "mesenchym-wirksamen" Substanzen wie BAPN. Die klassischen Teratogene vermögen zu einem kurzen, fest umrissenen Zeitpunkt Schäden zu erzeugen. Das beruht auf dem Vorkommen von Entwicklungsschritten, die ebenfalls in nur relativ kurzer Zeit ablaufen. Die Produktion der mesenchymalen Interzellularsubstanz ist aber ein ständig ablaufender Vorgang. Geringe Schäden durch kurze Einwirkung von Substanzen können kompensiert werden. Hier bedarf es länger dauernder Beeinflussung, um einen morphologisch fassbaren Effekt zu erzielen.

Darüber hinaus muß angenommen werden, daß die Veränderung der Kollagenaggregation als Folge der verminderten Hydroxylierung zwar die Vernetzung beeinflußt, aber nicht hundertprozentig jede Vernetzung unterdrückt. Das scheint auch der Grund zu sein für die geringen morphologischen Veränderungen an den vorhandenen Kollagenfibrillen selbst.

Unter diesen Aspekten ist das vermehrte Auftreten von Radiusdeformation nach Applikation von BAPN am Tag 13 besonders auffällig. Da die Versuche an identischem Material in parallel verlaufenden Reihen durchgeführt wurden, ist ein Unterschied im Tiermaterial wenig wahr-

scheinlich. Es ist allerdings bekannt, daß der phylogenetisch sehr junge Radius gegenüber teratogenen Einflüssen sehr empfindlich ist. Das ist aber wesentlich durch die kritische Blastenmenge in dieser Region und Umverteilungen des Blastems zugunsten der Ulna zu erklären (16).

Ob sich auch die mesenchymale bzw. knorpelige Interzellularsubstanz in ähnlicher Weise kritisch verhält, ist nicht bekannt und auch wenig wahrscheinlich.

Die übrigen Mißbildungen - besonders Deformationen - lassen sich zwanglos aus dem Wirkungsmechanismus, der in einer verringerten mechanischen Widerstandsfähigkeit resultiert, erklären (siehe oben). Die Stabilität scheint am Tag 16 soweit entwickelt zu sein, daß Applikationen an diesem Tag oder später nicht mehr die Form beeinflussen können. Jetzt wird eine neue kritische Stelle deutlich: die Epiphysenfuge. Es ist offenbar eine mechanisch stark belastete aber wenig stabile Stelle vorhanden, die am ehesten zusammenbricht. Diese Vorstellung wird durch Erfahrungen an Kindern und postnatalen Versuchstieren erhärtet. Auch kommt es bei schädigender Beeinflussung der Interzellularsubstanz zur Epiphyseolyse (44).

Interessant ist zunächst die unterschiedliche Zahl von Gaumenspalten nach Applikation an verschiedenen Tagen. Der Vorgang der Bildung des definitiven Gaumens setzt sich aber aus einer Fülle von Einzelschritten zusammen. Während am Tag 13 noch die Bildung und Stabilisierung der Gaumenfalten beeinflusst wird, dürfte an den Tagen 15 - 17 die mesenchymale Verknüpfung der jetzt hochgeklappten Falten und damit die mediale Verklebung gestört sein. Ähnliche Effekte sind bereits bei Störungen des lysosomalen Systems während der Verschmelzung der Falten bekannt geworden (15).

Unsere Befunde beweisen die Möglichkeit einer Schädigung der Skelettentwicklung auch in den späten Phasen der Schwangerschaft. Sicher ist als empfindlichste Phase das sogenannte Blastemstadium anzunehmen. Ohne jeden Zweifel aber gelingt es auch in den späteren Phasen, Skelettentwicklungsstörungen zu induzieren.

Hier ist natürlich die Definition des Begriffes "Mißbildung" kurz zu diskutieren. Der Begriff "teratogene Wirkung" bezieht sich - formal erklärt - auf die Erzeugung von klassischen Mißbildungen. Am Skelettsystem bedeutet das ein Auftreten von Aplasien oder deutlicher ausgeprägten Hypoplasien. In neuerer Zeit wird jedoch

der Begriff "Mißbildung" viel weiter gefaßt und bekommt sogar Beziehungen zu den allein funktionell erfaßbaren Störungen nach der Geburt (siehe Jahresberichte des SFB 29). Es ist deshalb bei dieser Auslegung des Begriffes durchaus berechtigt, die an unserem Material gefundenen Mineralisationsstörungen und Deformitäten als Mißbildung zu bezeichnen. Unter diesen Voraussetzungen muß BAPN auch am Ende der Schwangerschaft noch als teratogen wirksam gelten. Die Annahme, daß Arzneimittel nur während einer bestimmten Zeit der Schwangerschaft schädlich sind, beruht deshalb - wie auch unser Beispiel zeigt - auf falschen Vorstellungen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurden gravide Mäuseweibchen des Stammes NMRI während verschiedener Stadien der Trächtigkeit mit einer für das Muttertier relativ untoxischen Dosis β -Aminopropionitril (1000 - 1500 mg /kg Körpergewicht) gefüttert. Die Versuchstiere wurden am 18. Tag der Gravidität getötet, schnittentbunden und die Foeten teils für die Histologie und Elektronenmikroskopie präpariert, teils in typischer Weise aufgehellt.

Bei der makroskopischen Untersuchung der Foeten fielen zunächst große Hämatome unter der Haut - histologisch auch in den Organen wie Lunge, Leber und Muskel - auf, und zwar gehäuft bei mehrtägiger Behandlung und gegen Ende der Schwangerschaft.

Als Mißbildungen traten die schon von anderen Autoren beschriebenen Gaumenspalten und Deformierungen des harten Gaumens, sowie Verbiegungen und Formveränderungen der Rippen und Extremitätenknochen auf. Im Bereich der Wirbelsäule zeigten sich Kyphosen, Kyphoskoliosen und Stauchungen.

Bei Behandlung gegen Ende der Gravidität wurde eine deutliche Tendenz der Epiphysenplatten, sich vom Knochen zu lösen, bemerkt.

Histologisch zeigte sich eine Verminderung von Zahl und Dicke der Knochenbälkchen.

Elektronenmikroskopisch traten bei einer Applikation bis einschließlich Tag 15 keine deutlichen feinstrukturellen Veränderungen auf. Bei den Nachkommen der an den Tagen 16 und 17 p.c. behandelten Mäuse ergab sich jedoch eine Verringerung der Zahl der kollagenen Filamente, sowie eine gegenüber den Kontrollen verminderte Mineralisation in der perichondralen, desmalen Knochenmanschette.

Die Möglichkeit einer Schädigung der Skelettentwicklung auch in späten Phasen der Schwangerschaft durch bindegewebswirksame Substanzen scheint damit bewiesen.

Tab. 1

Verschiedene Parameter (Zahlen, Resorptionen und Gewicht) der verwendeten Mäusefoeten am Tag 18.

Tag p.c.	10-12	13	14	15	14-15	13-15	16-17	Kontrolle
Dosis mg/kg	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	-
Versuchstiere	4	6	5	14	6	10	5	10
lebende Embryonen	29	55	41	139	52	46	38	108
Resorptionen	8	5	2	10	9	39	2	2
mittleres Geburtsgewicht	1,19	1,19	1,41	1,25	1,25	1,11	1,07	1,23
Standardabweichung	0,10	0,10	0,11	0,2	0,15	0,13	0,19	-

Tab. 2

Skelettmaße der Nachkommen von an verschiedenen Tagen der Schwangerschaft mit BAPN behandelten Mäusen bzw. Zahl der Knochenkerne. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Tag p.c.	10-12	13	14	15	14-15	13-15	16-17
Os intra- parietale Länge	1,2	1,4	1,6	1,4	1,4	1,4	1,3
Breite	4,8	4,6	4,6	4,6	4,5	4,8	4,7
Costae	13	13,4	13	13,5	13,4	13,5	13,2
Humerus	2,4	2,6	2,6	2,4	2,4	2,6	2,3
Ulna	2,6	2,7	2,9	2,7	2,8	2,8	2,6
Radius	2,1	2,2	2,3	2,2	2,2	2,2	2,0
Femur	1,9	2,0	2,2	1,9	2,0	2,1	1,8
Tibia	2,2	2,3	2,5	2,3	2,3	2,1	2,1
Fibula	2,1	2,2	2,4	2,1	2,3	2,3	2,0
<u>Zahl der WK</u>							
Cervicales	7	7	7	7	7	7	7
Dorsales	13	13	13	13	13	13	13
Lumbales	6	6	6	6	6	6	6
Sacrales	5	5	5	5	5	5	5
Caudales	7,0	8	8,6	7,4	7,7	6,5	4,9

Tab.3

Häufigkeit der Mißbildungen nach oraler Gabe von BAPN während verschiedener Trächtigkeitsstadien bei der Maus.

Tag p.c.	10-12	13	14	15	14-15	13-15	16-17
Dosis (mg/kg /Tag)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1500
Anzahl der Aufhellungen	17	48	38	124	44	38	26
Gaumenspalten	-	45	-	22	15	35	-
Deform. d. Gaumens	2	-	-	1-	1	5	1
Deform. d. Humerus	-	-	-	-	-	5	-
d. Ulna	-	-	-	-	2	10	-
d. Radius	-	12	-	-	2	11	-
d. Femur	-	-	-	-	-	2	-
d. Tibia	-	1	-	-	7-	32	-
d. Fibula	-	1	-	1	7	28	-
d. Rippen	-	2	-	1	26	24	-
d. Brustkorbes	-	-	-	-	5	-	1
Kyphosen u. Kyphoskoliosen	-	-	-	11	2	22	2
abgelöste Epi-physenplatten	-	-	-	-	-	-	14

A=b=b=i=l=d=u=n=g=e=n

Abb. 1

Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg
BAPN/kg/Tag an den Tagen 13 - 15

a) Alizarinrot - Aufhellung

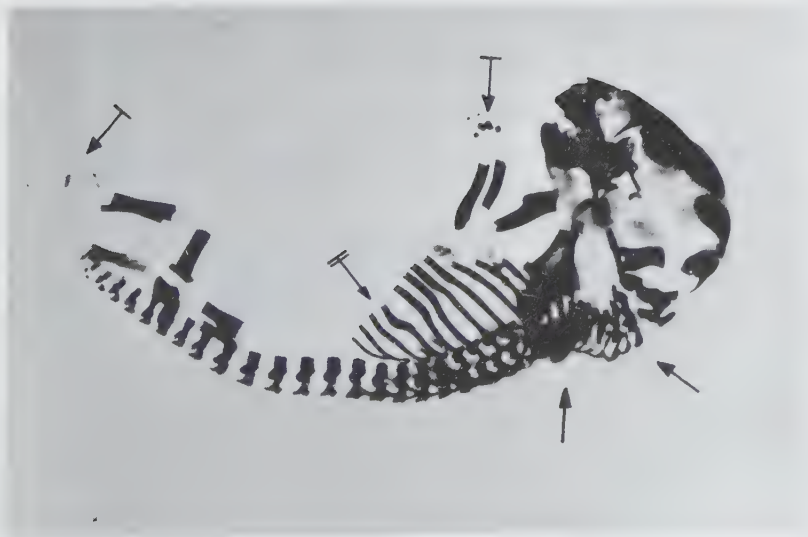
Deutliche Verbiegung der Wirbelsäule ($\rightarrow$), der
langen Röhrenknochen ($\rightarrow$) und deutliche Form-
änderung der Rippen ($\rightarrow$).

b) Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg
BAPN/kg/Tag an den Tagen 14 - 15

Verbiegung der Wirbelsäule und Verschiebung der
Wirbelkörper im Halsbereich ($\rightarrow$). Fehlen bzw.
Verkürzung der tarso-metatarsalen bzw. carpo-
metacarpalen Skelettanlagen ($\rightarrow$). Angedeutete
Verbiegung der Rippen ($\rightarrow$).



a)



b)

Abb. 2

Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg

BAPN/kg/Tag an den Tagen 14 - 15

Deutliche Kyphose im Bereich der Brustwirbelsäule.

b) Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg

BAPN/kg/Tag an den Tagen 14 - 15.

Leichte Verformung der Wirbelsäule (→), der

Röhrenknochen-Anlagen (→) und der Rippen (→).



a)



b)

Abb. 3

Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg
BAPB/kg/Tag an den Tagen 13 - 15.

- a) Fotografie einer Gaumenspalte von unten her gesehen mit noch existierenden Randwülsten (x) und in der Tiefe das Nasenseptum (*).
- b) Alizarinrot - Aufhellung mit einem Spalt zwischen den Ossa palatina (→).
- c) Alizarinrot - Aufhellung
Spalt zwischen den beiden Ossa palatina und
deutliche Verbiegung.

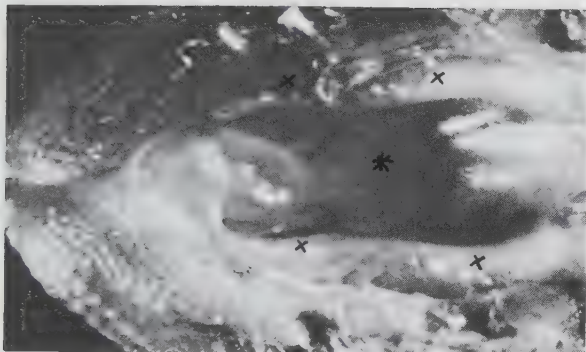
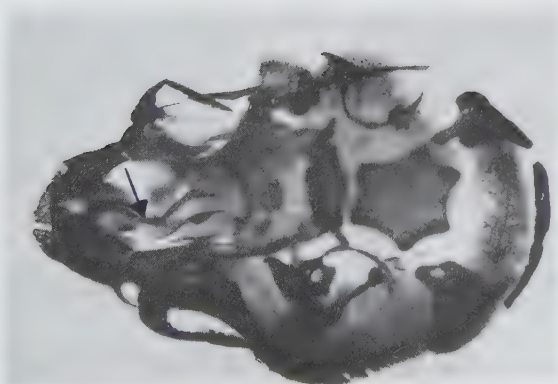


Abb. 3

a)



b)



c)

Abb. 4

Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg
BAPN/kg/Tag an den Tagen 14 - 15.

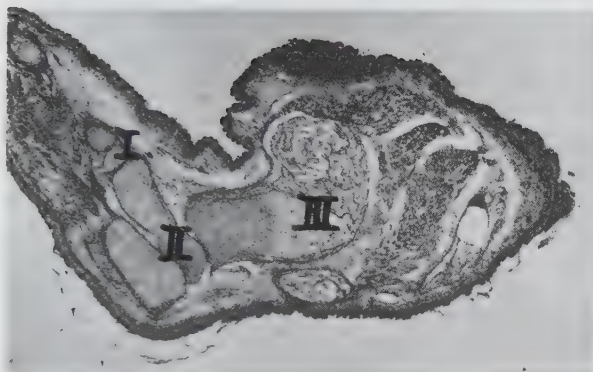
Histologischer Schnitt, HE - Färbung.

a) Schnitt durch die obere Extremität mit Carpus-
Anlagen (I). Radius-Ulna-Anlagen (II) angedeutet
verbogen und deutlich verformte Humerus-Anlage (III).

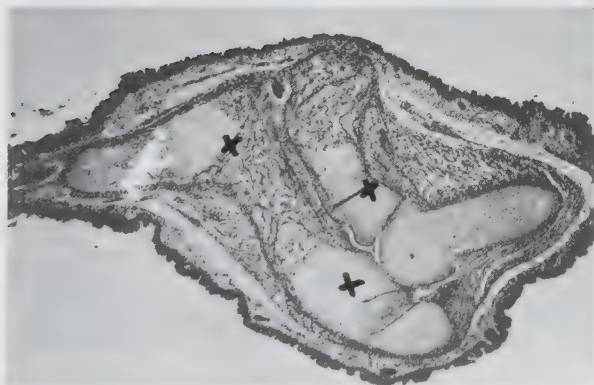
b) Schnitt durch die obere Extremität mit starker
Verformung der Skelett-Anlagen (x).

c) Höhere Vergrößerung der Humerus-Anlage mit
Säulenknorpel (I), Blasenknorpel (II) und
primärer Markhöhle (III) mit Zerreißungen (x)
und fast fehlender Ossifikation besonders im
perichondralen Bereich (→).

Abb. 4



a)



b)



c)

Abb. 5

Mäusefoet vom Tag 18 nach Behandlung mit 1000 mg
BAPN/kg/Tag an den Tagen 14 - 15.

Histologischer Schnitt, H.-E.-Färbung.

a) Ausgeprägte Kyphosebildung der Wirbelsäule.

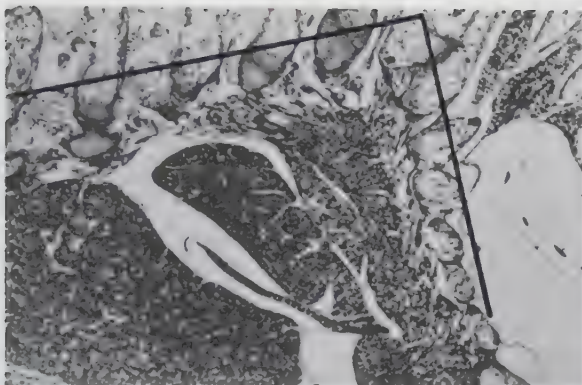
b) Geringere Veränderungen an der Wirbelsäule, z.B.

Unterschiede in der Länge der Segmente.

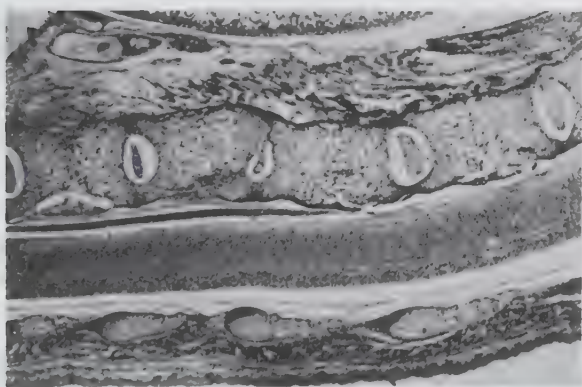
c) Nekrosen (x) in der Leber eines Muttertieres

mit zellulärer Infiltration in die Peripherie (→).

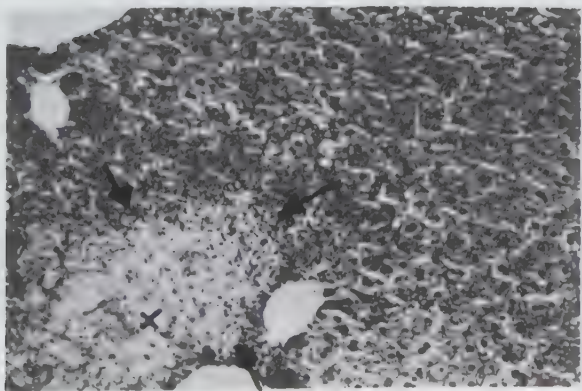
Abb. 5



a)



b)



c)

Abb. 6

Mäusefoet vom Tag 18, unbehandelte Kontrolle.

Humerusanlage mit Knorpelzellen, elektronenmikroskopische Aufnahme:

N (Nucleus), ER (rauhes endoplasmatisches Retikulum),
G (Glykogen), GA (Golgi-Apparat).

Im Interzellularraum (I) zahlreiche, filamentartige
Kollagenstrukturen und granulaartiges Proteoglycan (O).

Vergrößerung 1 : 14.000

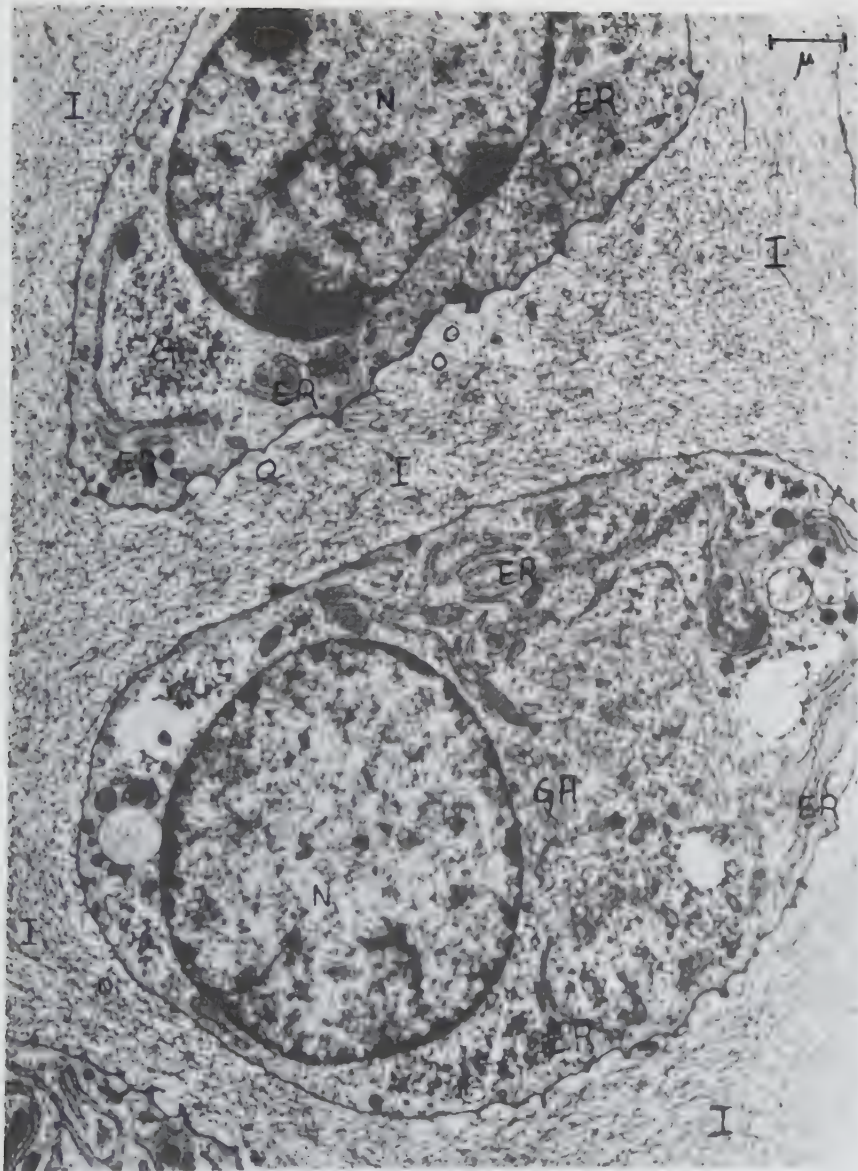


Abb. 7

Wie Abb. 6, jedoch behandelt mit 1.500 mg BAPN/kg/Tag
an den Tagen 16 - 17:

Typische Knorpelzellen: N (Nucleus), ER (rauhes endo-
plasmatisches Retikulum, G (Glykogen), GA (Golgi-Apparat).
Im Interzellularraum (I) nur sehr wenige Filamente und
Granula, stellenweise sogar optisch leere Räume (x).

Vergrößerung 1 : 21.000

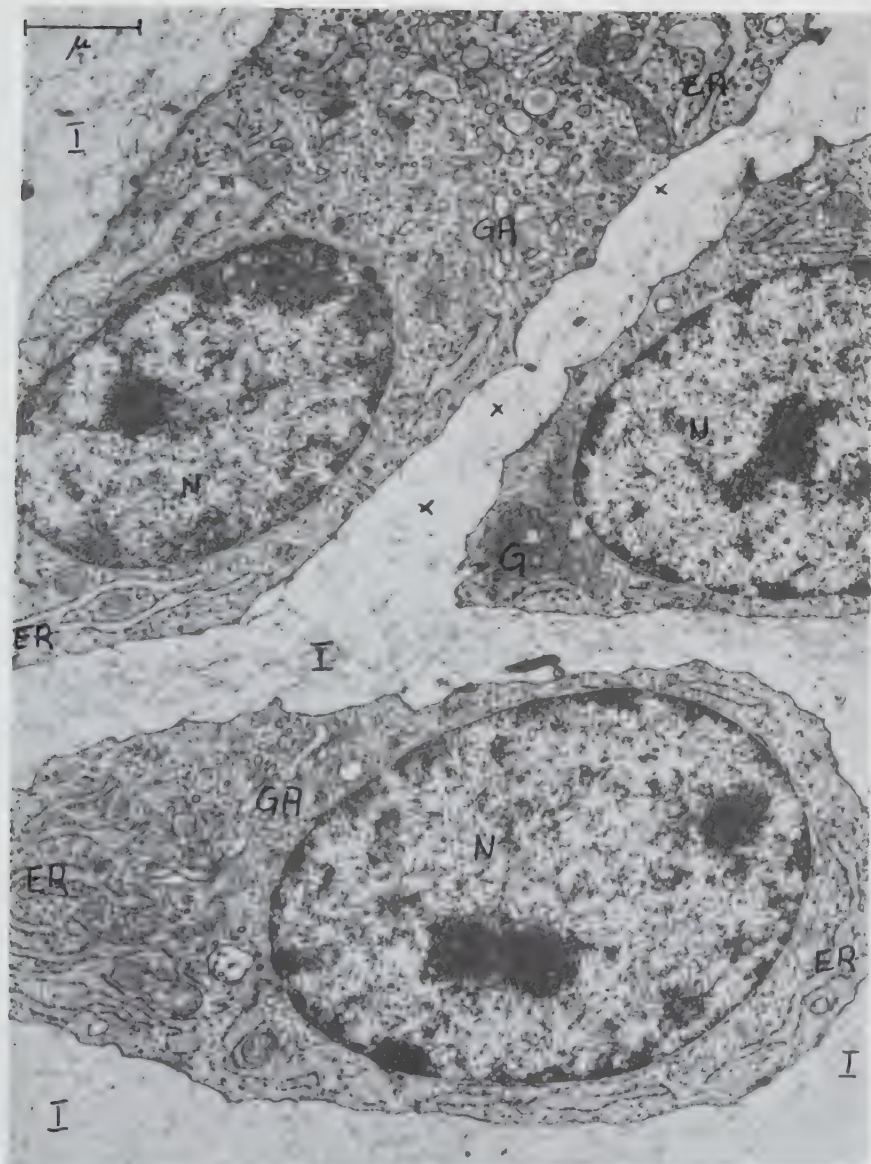


Abb. 8

Mäusefoet vom Tag 18, unbehandelte Kontrolle,

elektronenmikroskopische Aufnahme:

Knorpelzellen während der Interzellularbildung in
der Peripherie der Epiphyse.

N (Nucleus), ER (rauhes endoplasmatisches Retikulum),

G (Glykogen), GA (Golgi-Apparat).

Vergrößerung: 1 : 35.000

Abb. 8

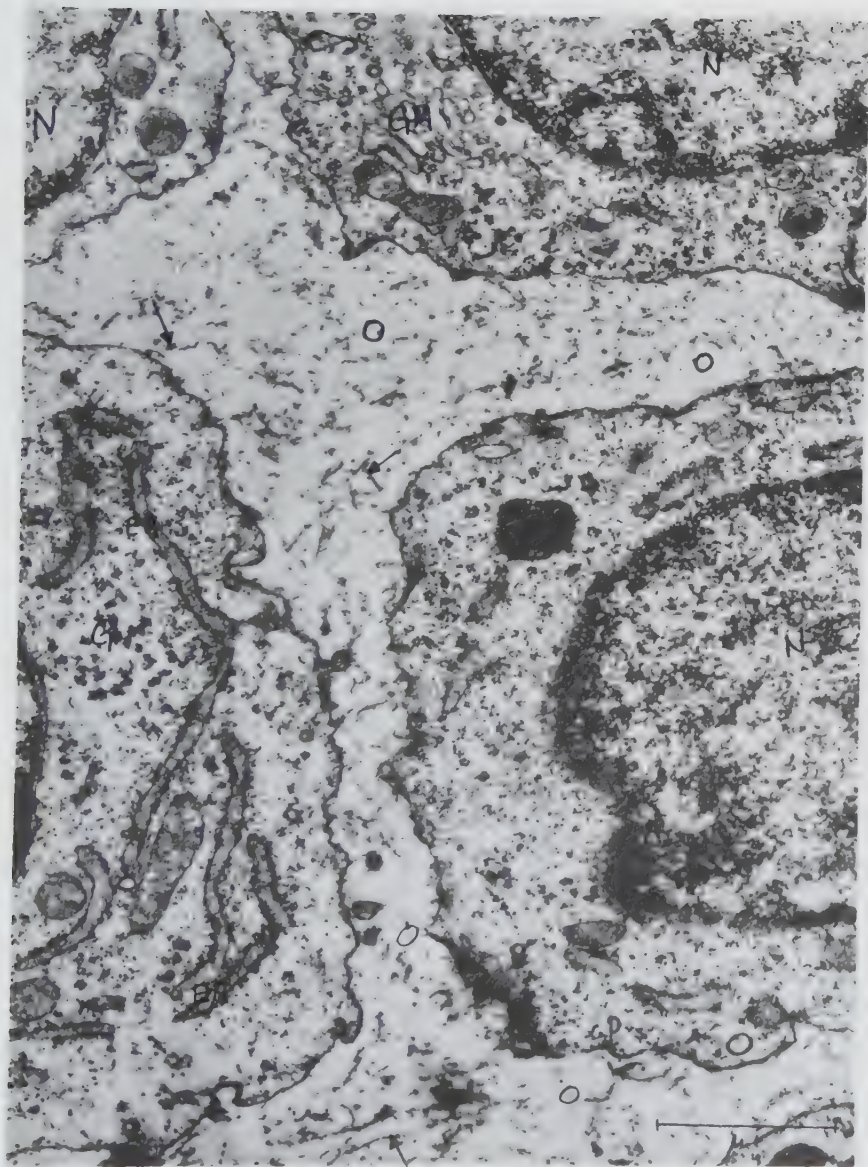


Abb. 9

Wie Abb. 8, jedoch behandelt mit 1.500 mg BAPN/kg/Tag
an den Tagen 16 - 17:

N (Nucleus), ER (rauhes endoplasmatisches Retikulum),
G (Glykogen).

Im Interzellularraum deutlich weniger Kollagenstruk-
turen (→). Offenbar unveränderte Menge an Proteo-
glycangranula.

Vergrößerung 1 : 35.000

Abb.9

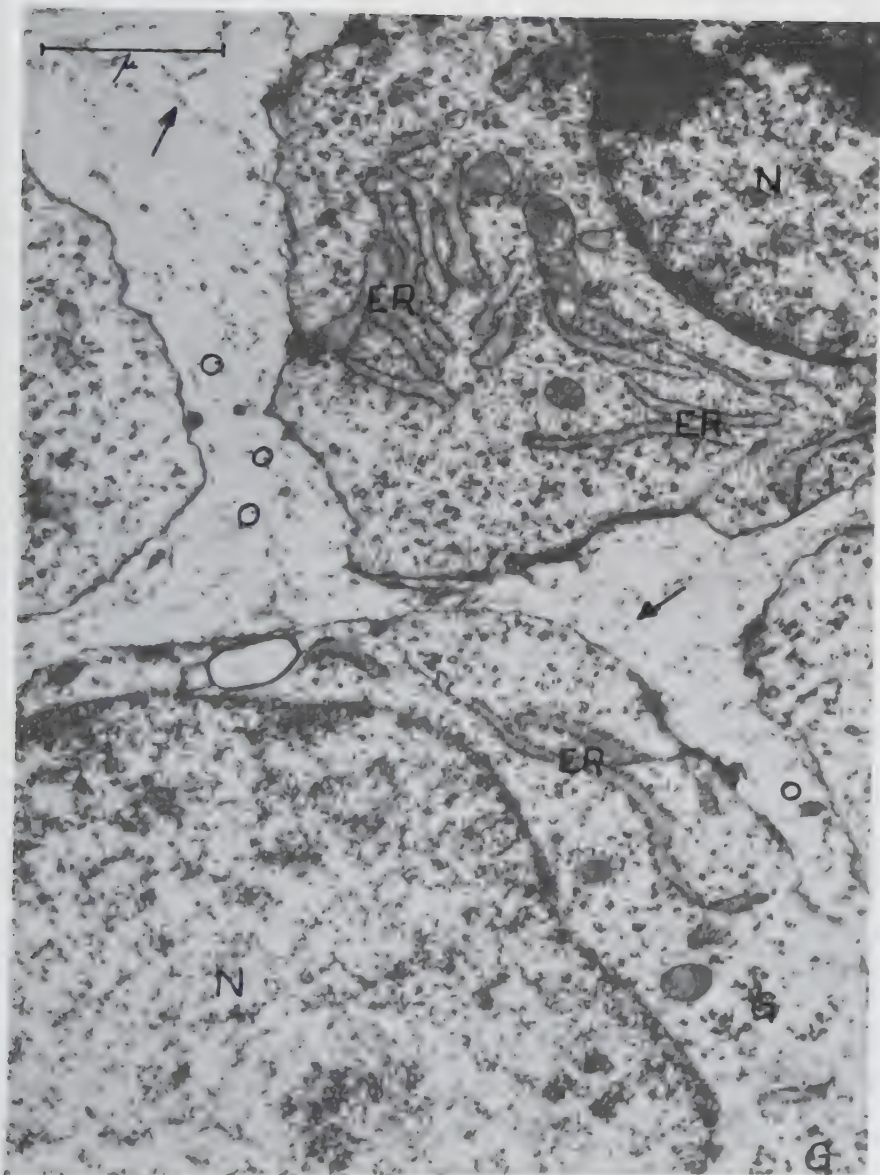


Abb. 10: Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild von der perichondralen Knochenmanschette (x) des Radius eines unbehandelten Kontrollembryos (Maus) vom Tag 18. Im rechten Bildbereich Blasenknorpelzellen (b), links Osteoblasten (o). Vergrößerung 1 : 3 500

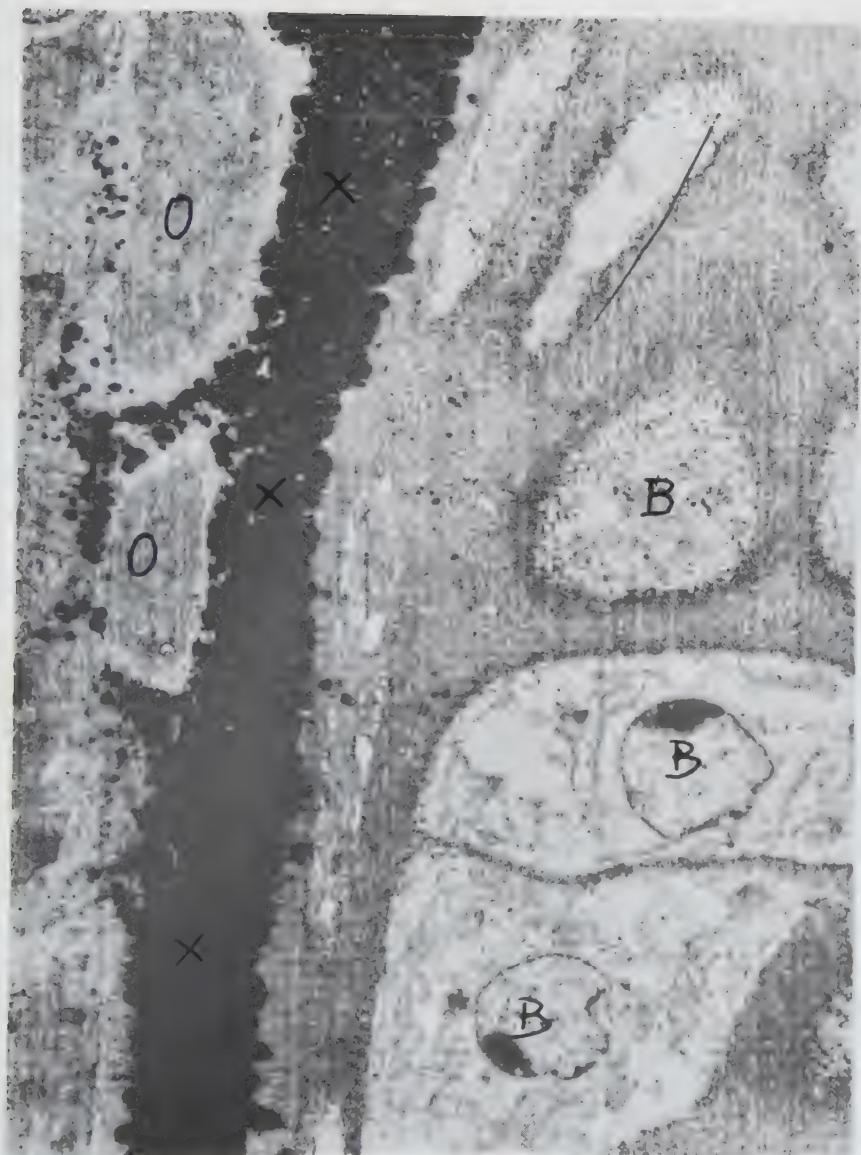
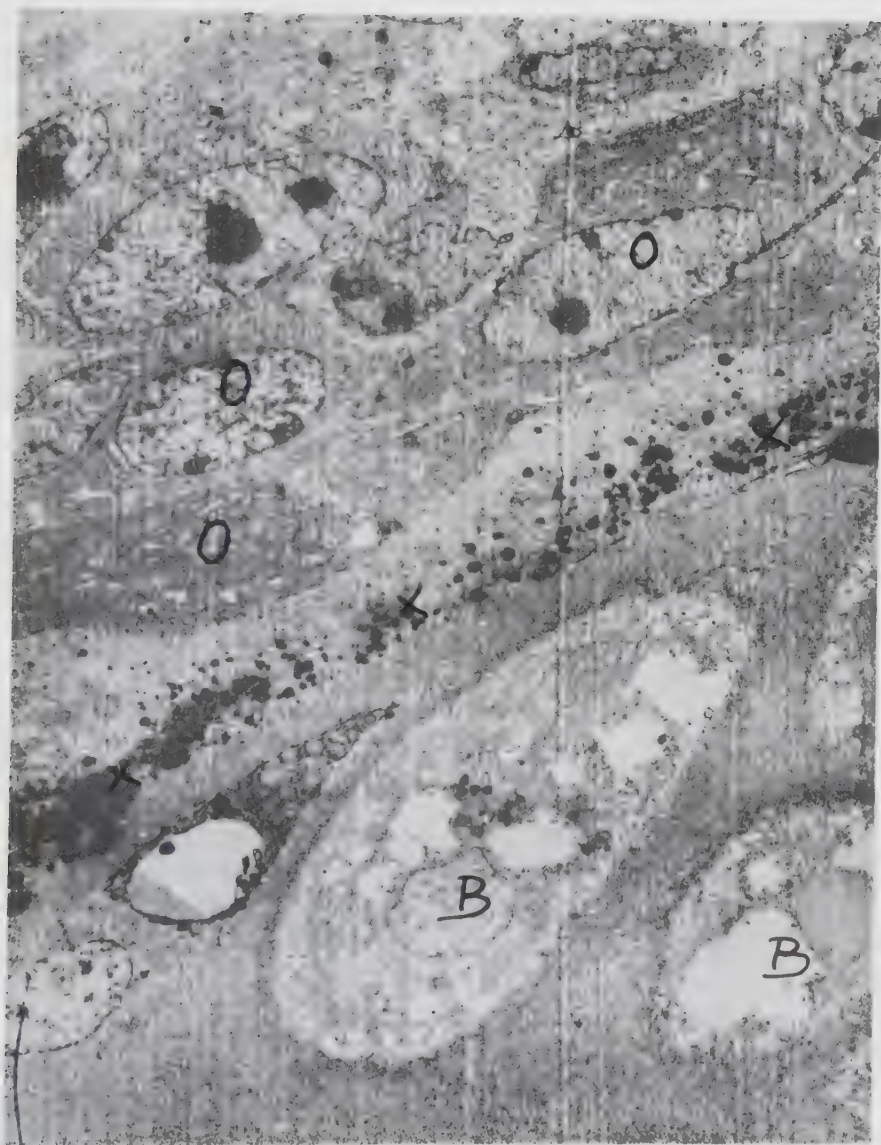


Abb. 11: Wie Abb. 10, jedoch von einem Embryo aus einer behandelten Gruppe (Tag 16 und 17). Deutlich geringere Ausdehnung der mineralisierten Abschnitte (x), Glasenknorpelzellen (B), Osteoblasten (O).
Vergrößerung 1 : 3 500



LITERATURVERZEICHNIS

1. ADHAMI, H., W. NOACK, P. INOKA:
The effects of 6-Mercaptopurine on the developing
rat central nervous system.
7. Int. Cong. Neuropathol. - Excerpta
Medica Verlag (Amst.) 411 - 416 (1975)
2. ALEO, J.:
Collagen synthesis in cultured cells:
The influence of Beta-Aminopropionitrile.
P. S. E. B. M. 1969 Vol. 130
3. ASSISI, A., H.J. MERKER:
Über eine besondere Form von Extremitätenmißbil-
dungen bei Ratten von 6-Mercaptopurin am Tag 12
der Schwangerschaft.
Arzneimittelforschung, im Druck
4. BACHRA, B.N.:
Calcification in vitro of demineralized bone matrix.
Calc. Tiss. Res. 8 287 - 303 (1972)
5. BORCK, C.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Differenzierung des Blastems zu den Extremitäten
zum embryonalen Vorknorpel.
Acta Anat. 97 423 - 434 (1977)

6. CAMERON, D.A.:
The fine structure of bone and calcified cartilage
Clin. Orthop. 26 199 - 228 (1963)
7. CHANG, C.Y., E. WITSCHI, I.V. PONSETI:
Teratogenic effects of lathyrus odoratus seeds
on development and regeneration of vertebrate.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90 45 (1955)
8. COULSON, W.F., A. LINKER, E. BOTTCHE:
Lathyrism in swine.
Arch. Path. (Chicago) 87 411 - 417 (1969)
9. FIRSCHEIN, H.E.:
Collagen turnover in calcified tissue.
Arch. Biochem. Biophys. 119 119 - 123 (1967)
10. FLEISCH, H.:
Role of nucleation and inhibition on calcification.
Clin. Orthop. 32 170 - 183 (1964)
11. FRANKE, C.
Morphologische Untersuchung der Wirkung von
D-Penicillamin auf Rattenfoeten.
Inaugural-Dissertation an der FUB (1976)
12. GIESEKING, R.:
Mesenchymale Gewebe und ihre Reaktionsformen im
elektronenmikroskopischen Bild.
G. Fischer, Stuttgart 1966

13. GLIMSCHER, M.J., A.J. HODGE, F.O. SCHMITT:
Macromolecular aggregation states in relation
to mineralization. The collagenhydroxyapatite
as studied in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. 43 860 - 864 (1957)
14. GOLUP, L., B. STERN, M.J. GLIMSCHER, P. GOLDHABER:
The inhibition of the maturation of newly synthesized
bone collagen by Beta-Aminopropionitrile
in tissue culture.
P.S.E.B.M. (1968) Vol. 129
15. GREENE, R.M., D.M. KOCHHAR:
Some aspects of corticosteroid induced cleft
palate: A review.
Teratology 11 47 - 56 (1975)
16. GRÜNEBERG, H.:
The pathology of development.
Oxford: Blackwell Scientific Publication (1963)
17. HALLSWORTH, A.S.:
Aspects of calcification.
Biochem. J. 93 232 - 260 (1964)
18. HENNEMANN, D.H.:
Inhibition by Estradiol - 17 of the lathyriform
effect of Beta-Aminopropionitrile (BAPN) on
skin and bone collagen.
Basic Science and Pathology Section III,
245 - 254 (1972)

19. KIVIRIKKO, K.J., L. RASTELLI:
Biosynthesis of collagen and its alteration in
pathological states.
Med. Biol. 54 159 - 186 (1976)
20. LALICH, J., D. ANGEVINE:
Dysostosis in adult rats after prolonged Beta-
Aminopropionitrile feeding.
Arch. Path. Vol. 90 (1970)
21. LANE, J.M., P. DEHM, D.J. PROCKOP:
Effect of the proline analogue azetidine-2-carboxylic
acid on collagen accumulation in growing chick
embryos.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 236 517 - 527 (1971)
22. LANGMANN, J.:
Teratological considerations.
In: II. Symposium des Sonderforschungsbereiches 29,
1975 Thieme-Verlag
23. LEVENE, C.I.:
Lathyrism
In: Molecular pathology of connective tissue.
M. Dekker, Inc., New York 1973
24. LEVENE, C.I., C.J. BATES, A.J. BAILY:
Biosynthesis of collagen cross links in cultured
3T6-fibroblasts. Effects of lathyrogens and asor-
bics acid.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 263 574 - 582 (1972)

25. LEVENE, C.L., J. GROSS:
Alterations in state of molecular aggregation
of collagen induced in chick embryos by Beta-
Aminopropionitrile (Lathyros factor)
J.exp.Med. 110 771 - 779 (1959)
26. LONGDEN, M.:
Die Wirkung von Tetracyclinen auf die Skelett-
entwicklung.
Inaugural-Dissertation FU-Berlin (1974)
27. MERKER, H.J.:
Entstehung und Reifung des Bindegewebes und die
pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge.
Symposium Mai 1974 (Timmendorf)
28. MERKER, H.J.:
Considerations on problem of "critical period"
during limb bud development.
Titisee-Symposium, Juni 1975
29. MERKER, H.J.:
Entwicklung und Reifung des Mesenchyms und Störungen
dieser Vorgänge.
Jahresbericht 1971/72 des Sonderforschungsbereiches
29, Projekt IIaE, 240 - 259
30. MERKER, H.J.:
Die Kapitel "Knochengewebe" und "Knorpelgewebe" in:
Benninghoff - Göertler, Anatomie des Menschen
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1975)

31. MERKER, H.J.:
Das elektronenmikroskopische Bild des
Blasenknorpels.
Verhdl. d. Anat. Gesellschaft 121
301 - 307 (1968)
32. MERKER, H.J., L. FRANKE, T. GÜNTHER:
The effects of D-Penicillamin on skeletal
development of rat foetuses.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287
359 - 376 (1975)
33. MERKER, H.J., L. FRANKE, T. GÜNTHER:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
D-Penicillamin-Wirkung am Knorpel embryonaler
Ratten (Tag 16) in vitro.
Virchows Arch. (B) 12 51 - 60 (1972)
34. MERKER, H.J., P. MEWES, M. POSPISIL:
Cytotoxic effect of 6-Mercaptopurin on the blastemal
cells in limb buds of rat embryos.
Teratology 11 199 - 218 (1975)
35. MERKER, H.J., K.H. TOEPFER, T. GÜNTHER:
Effect of pentosanpolysulfate SP 54 on the
collagen of embryonic limb buds culture.
Experientia 33 657 (1977)
36. NARAYANAN, S.A., R.C. SIEGEL, G.R. MARTIN:
On the inhibition of lysyl oxidase by
Beta-Aminopropionitrile.
Biochim. Biophys. Res. Com. Vol. 46 (1972)

37. NEUBERT, D., H.J. MERKER, E. KÖHLER, D. KROWKE,
J. BARRACH:
Biochemical aspects of teratology.
Adv. in Biosciences 6 575 - 622, (1970)
38. NOACK, W., H.J. MERKER:
Zellstoffwechsel der Bindegewebszelle.
Dermatol. Forsch. 244 112 - 116 (1972)
39. PAGE, R.C., E.P. BENDITT:
Diseases of connective and vascular tissues
IV. The molecular basis for lathyrism.
Lab. Invest. Vol. 26 1 - 22 (1972)
40. PONSETI, I.V., R.S. SHEPARD:
Lesion of skeleton and of other mesodermal
tissue in rats fed sweet pea (Lathyrus odoratus)
seeds.
J. Bone J. Surg. 36 A, 1031 (1954)
41. PRATT, R. M., C.T.G. KING:
Inhibition of collagen cross-linking associated
with β -Aminopropionitrile-induced cleft palate in
the rat .
Develop. Biol. 27 322 - 328 (1972)
42. PRIEST, R.E.:
Biosynthesis of collagen and elastin.
In: Molecular pathology of connective tissue.
M. Dekker, Inc., 105 - 134 New York (1973)

43. PYÖRÄLÄ, K., T. SEPPÄLÄ, S. PUNSAR:
Aorten- und Knochenveränderungen beim Ratten-
foetus verursacht durch Fütterung von Lathyrus-
Samen an Muttertiere.
Acta Path. Microbiol. Scand. 38 273 (1956)
44. RAUTERBERG, K.:
Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese
der Epiphyseolysis capitis femoris.
Beobachtungen an menschlichem Biopsiematerial
und tierexperimentelle Verlaufsstudie.
Habilitationsschrift, Med. Fakultät Heidelberg 1975
45. ROBINSON, R.A.:
An electronmicroscope study of the crystalline
inorganic component of bone at its relationship
to the organic matrix.
J. Bone J. Surg. 34 389 - 435 (1952)
46. ROLL, R., F. BÄR:
Untersuchungen über die teratogene Wirkung von
Beta-Aminopropionitril bei trächtigen Mäuse-
weibchen.
Arzneimittelforschung 18 806 - 814 (1968)
47. SHIMIZU, M., L. GOLUP, M. GLIMCHER:
The effect of lathyrogens on the rate of collagen
fibril formation and dissolution.
Biochem. Biophys. Acta 168 356 - 358 (1968)

48. SIMPSON, C.F.:

Sotalol for the protection of turkeys from the development of Beta-Aminopropionitile - induced aortic ruptures.

Brit. J. of. Pharm. Vol. 45 3, 385 (1972)

49. SPIELMANN, H.:

Stoffwechseluntersuchungen an Präimplantationsstadien (Ratte und Maus) und Transplantationsversuche nach Einwirkung von Pharmaka.

Jahresbericht 1971/72 des Sonderforschungsbereiches 29, Projekt IIbI, 174 - 179

50. STAMLER, F.W.:

Reproduction in rats fed lathyrus peas or Aminonitriles.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90 294 (1955)

51. STEFFEK, A.J., A.C. VERRUSO, C.A. WATKINS:

Cleft palate production in rodents treated with lathyrogenic agents.

Teratology 5 71 - 80 (1972)

52. STEFFEK, A.J., A.G. HENDRICK:

Lathyrogen-induced malformations in baboons:

A preliminary report.

Teratology 5 171 - 189 (1972)

53. STIVERS, F.E., A.J. STEFFEK, C.T. YARINGTON:

The effect of lathyrogens on developing midfacial structures in the rat.

J. Surg. Res. 11 415 - 420 (1971)

54. TELLER, C., H.J. MERKER, T. GÜNTHER:
Über das Verhalten und die Lokalisation der
alkalischen Phosphatase während der Skelett-
entwicklung bei Rattenfoeten.
Histochemie 27 193 - 204 (1971)
55. WALKER, D.G., Z.T. WIRTSCHAFTER:
Resorption of embryos in rats on lathyrus
odoratus diet.
J. Nutrit. 58 147 (1956)
56. WILK, A.L., C.T.G. KING, E.A. HORIGAN, A.J. STEFFEK:
Metabolism of Beta-Aminopropionitrile and its tera-
togenic activity in rats.
Teratology 5 41 - 48 (1972)
57. WODTKE, A.:
Mineralisation des Vorknorpels. Das elektronen-
mikroskopische Bild des verkalkenden Vorknorpels
bei Mäuseembryonen.
Dissertationsschrift (1972)

Ich danke Herrn Prof. Merker für die Vergabe
des Themas und Hilfe bei der Durchführung der
Arbeit, sowie Frau Stürje für die Unterstützung
bei der praktischen Ausführung.

Lebenslauf

Name: Sigrid Irmgard Eva Klingner geb. Barth

Geburtstag: 7. Januar 1948

Geburtsort: Berlin - Steglitz

Konfession: evangelisch

Eltern: Jürgen Barth (Technische Universität Berlin, Institut für Gartenbau und Landschaftsgestaltung) und Ehefrau Waltraud, geborene Beutler

Eheschließung: 21. Juni 1977 mit dem Ingenieur Hartmut Klingner

Ausbildung: 1954 - 1960 3. Grundschule Steglitz
1960 - 1967 Fichtenberggymnasium
(Berlin-Steglitz) mit
abschließender Reifeprüfung
1967 - 1973 Medizinstudium an der
Freien Universität Berlin
(Vorphysikum 1969,
Physikum 1970, Staatsexamen
1973)
Medizinalassistentenzeit in
Bad Harzburg (4 Monate
Chirurgie, 4 Monate Anaesthe-
sie) und in Einbeck (4 Mo-
nate Innere Medizin).
Vom 1.1.1975 bis zum 30.6.1976 Assistenz-
ärztin in der Anaesthesieabteilung der
Kreiskrankenanstalten Bad Harzburg.

Seit dem 1.7. 1976 als Assistenz-
ärztin im Institut für klinische
Anaesthesie der Georg-August-Uni-
versität in Göttingen tätig, um
hier die Fachausbildung für Anaesthe-
sie und Wiederbelebung zu vervoll-
ständigen.

